

Корисна модель, що заявляється, стосується медицини, точніше нейрон-хірургії, і призначена для лікування органічних уражень ЦНС у дорослих та дітей шляхом використання ін'єкцій клітинних суспензій, що містять аlogenні ембріональні клітини.

До органічних уражень ЦНС відносять дитячий церебральний параліч (ДЦП), розсіяний склероз (РС), та інші захворювання. Термін ДЦП поєднує групу синдромів, що виникають як наслідок ушкодження мозку в перинатальному періоді і проявляються нездатністю дитини утримувати нормальну позу та вільно виконувати рухи [1]. Рухові розлади (паралічі, парези, порушення координації, примусові рухи) у дітей з ДЦП можуть супроводжуватися змінами психіки, мови, зору, слуху, судомними нападами). РС - це невиліковне автоімунне захворювання нервової системи з невідомою етіологією, в ініціюванні якого важливу роль відіграють вірусна інфекція, спадкова схильність, що реалізується полігенною системою, відповідальною за формування імунної відповіді, і особливості типу метаболізму, а також досі невідомі географічні фактори [2].

Характерною для органічних уражень ЦНС є наявність у хворих ознак антигенспецифічних реакцій на білки ЦНС, які можуть впливати на перебіг захворювання.

У численних дослідженнях було висунуто припущення, що в репаративний процес при органічних ураженнях ЦНС включається загальний попередник усіх клітин нервової тканини - нейрогенні стовбурові клітини, дефіцит яких є визначальною ознакою, наприклад, РС. Це й зумовило застосування для лікування органічних уражень ЦНС клітин ранніх термінів гестації, бо в ці строки розвитку ембріон містить багато стовбурових клітин.

На сьогоднішній день одним з підходів до лікування органічних уражень ЦНС є застосування аlogenної ембріональної нервової тканини та клітин, отриманих з аlogenної нервової тканини ембріону. Цей підхід є ефективним з точки зору застосування ембріональних нервових клітин з високим відновлювальним потенціалом, які можуть продукувати трофічні фактори та самі інтегруватися в ЦНС реципієнта. Вони можуть здійснювати замісний ефект, поповнюючи кількісний склад попередників клітин нервової системи, забезпечуючи тим самим умови для ремієлінізації аксонів, зменшення моторного дефіциту у хворих на РС, покращення основних рухових комплексів, та створення передумов для посилення локомоторної активності хворих на ДЦП, зменшення інтелектуальних порушень.

Одним з обмежень, які стримують використання вищеописаного підходу до лікування хворих з органічними ураженнями ЦНС, є наявність у частини хворих ознак нейроантигенспецифічних процесів в імунній системі. Вони виявляються при імунологічному обстеженні периферичної крові перед початком та на етапах лікування. Ознаки антигенспецифічних реакцій на нейробілки виявляються у третини хворих на ДЦП [3] та у 70% хворих на РС [4, 5]. Існує думка, що наявність антигенспецифічних реакцій у неврологічних хворих, наприклад у хворих на РС, не тільки віддзеркалює ступінь ураження тканини ЦНС, але й корелює з варіантом стану імунної системи конкретного хворого [4]. Більш того, антитіла до білків ЦНС або їх імунологічно активні фрагменти вже використовуються як ремієлінізуючі сполуки в лікуванні демієлінізуючих захворювань людини [6]. Проте прямих доказів клінічної значущості автоантитіл до ОБМ при РС ще замало [5], остаточно не доведено, що фактори автоімунітету (антитіла) не сприяють хронізації патологічного процесу в ЦНС та не погіршують його перебіг. Тому, на нашу думку, важливо запобігати застосуванню методик клітинної терапії при захворюваннях ЦНС у хворих з вираженими ознаками автоімунітету до нейробілків. Крім того, не можна залишити без уваги той факт, що лікування органічних уражень ЦНС у частини хворих може опосередковано (через зміни балансу цитокінів і регуляторних лімфоцитів) створювати умови для розвитку імунної відповіді на циркулюючі антигени, внаслідок чого можуть з'являтися лабораторні ознаки автоімунітету до нейробілків і, відповідно, виникають сумніви щодо призначення чергового курсу клітинної терапії. Це ускладнює лікування, особливо в тих випадках, коли попередні курси лікування ембріональними нейроклітинами привели до значного покращення. Отже, існуючі підходи до лікування органічних уражень методами трансплантації аlogenних ембріональних нейроклітин мають суттєве обмеження у застосуванні - їх не бажано застосовувати у хворих з ознаками автоімунітету, які можуть з'являтися на етапах лікування, навіть, якщо їх не було перед операцією, а це ускладнює тактику подальшого лікування хворих.

Найближчим аналогом (прототипом) способу лікування запально-дегенеративних захворювань ЦНС, що заявляється, є спосіб, що передбачає використання стовбурових клітин, в якості яких застосовують аlogenні ембріональні нейроклітини. Цей спосіб включає заготівлю, кріоконсервування, ін'єкційне ендолюмбальне введення цих клітин в кількості 30-40млн. за одну трансплантацію, яких може бути 1-3 на курс лікування [7].

Описаний спосіб дозволяє досягти лікувального ефекту тільки у частини пацієнтів, а саме у тих з них, хто не мав ознак автоімунітету до початку лікування. Це можна пояснити тією обставиною, що спосіб не передбачає врахування вихідного стану імунної системи хворих з запально-дегенеративними ураженнями ЦНС і, зокрема, не встановлює наявності ознак автоімунітету до нейроантигенів. За умови наявності ознак автоімунітету до нейроантигенів ембріональні нейроклітини, що вводяться ендолюмбально, можуть швидко інактивуватись чи гинути, їх відновний вплив може бути мало суттєвим, а результат лікування - незначним.

Завдання, яке вирішує корисна модель, що заявляється, полягає в удосконаленні способу лікування органічних уражень ЦНС з використанням аlogenних ембріональних нейроклітин за рахунок введення додаткового етапу лікування - усунення лабораторних ознак автоімунітету перед власне лікуванням шляхом внутрішньовенного введення клітин печінки ембріону людини (строк гестації 7-9 тижнів), які вміщують гемопоетичні стовбурові клітини, здатні індукувати толерантність до автоантигенів. Таким чином, будуть створюватися умови для більш ефективного відновного впливу аlogenних ембріональних нейроклітин. Нейроклітини зможуть функціонувати в ЦНС хворого на тлі толерогенної дії гемопоетичних клітин на автоімунітет. Це буде сприяти продукції трофічних факторів та інтеграції нейроклітин в ЦНС реципієнта, замісному ефекту, поповненню кількісного складу клітин-попередників, забезпечуючи тим самим умови для ремієлінізації аксонів, відновлення нервової тканини і зменшення моторного дефіциту у хворих на запально-дегенеративні ураження ЦНС.

Технічний результат, що досягається корисною моделлю, буде полягати у зменшенні обмежень до застосування аlogenних ембріональних нейроклітин в лікуванні органічних уражень ЦНС та у створенні передумов для посилення локомоторної активності цих хворих.

Поставлене завдання досягається тим, що у відомому способі лікування органічних уражень ЦНС з використанням алогенних ембріональних нейроклітин, який включає заготівлю останніх та їх ін'єкційне ендолюмбальне введення, згідно корисної моделі, хворого до лікування додатково обстежують з метою виявлення ознак автоімунітету до нейробілків і, за наявності таких ознак, одноразово внутрішньовенно вводять алогенні ембріональні клітини печінки (строк гестації 7-9 тижнів) в кількості 90-100млн. за одну ін'єкцію, після чого через 2-3 місяці, після повторного імунологічного обстеження, за відсутності ознак автоімунітету до нейробілків, трансплантують алогенні ембріональні нейроклітини у вигляді клітинної суспензії у кількості 30-40млн. за одну ін'єкцію, яких всього може бути 2-3.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є те, що хворому з органічним захворюванням ЦНС перед лікуванням додатково проводять обстеження імунної системи для виявлення лабораторних ознак автоімунітету до нейробілків, при необхідності усувають ці прояви за допомогою внутрішньовенного введення клітин ембріональної алогенної печінки, а вже потім трансплантують алогенні ембріональні нейроклітини. Такий підхід забезпечує поновлення структури нервової тканини в умовах створеної на час лікування відсутності у хворого виражених антигенспецифічних реакцій на нейробілки, а на наступному етапі лікування - доставку необхідних клітинних субстанцій у місце руйнування тканини ЦНС, що суттєво знижує небажані втрати лікувального ефекту, пов'язані з можливим швидким розпадом трофічних факторів та загибеллю стовбурових клітин, які становлять більшість серед ембріональних нейроклітин даного строку гестації. Це дозволяє суттєво покращити результати лікування рухових порушень у хворих і знизити частоту розвитку ускладнень, зменшити ступінь рухового дефіциту, покращити зір, інтелектуальні можливості, поновити інші втрачені функції.

За відомими літературними даними такий спосіб лікування органічних уражень ЦНС не відомий.

Запропонований спосіб лікування здійснюється наступним чином. Забір печінки і мозку ембріону людини проводять під час переривання фізіологічної 7-9 тижневої вагітності з дотриманням вимог чинного законодавства України та міжнародних правових норм. Тканину печінки та закладку кори ембріонального мозку суспендують фізичним методом (кожну тканину окремо). Одну частину клітин кожного із зразків використовують для кріоконсервування, а другу частину обстежують на вірусну та бактеріологічну інфікованість. Перед використанням суспензій гепатоцитів і нейроклітин визначають їх фізико-хімічні властивості, концентрацію клітин, життєздатність, морфологічні показники, функціональну повноцінність, адгезивний потенціал.

Хворого з органічним ураженням ЦНС перед лікуванням додатково обстежують імунологічно з метою визначення імунного статусу та лабораторних ознак автоімунітету (виявлення підвищеного антитілоутворення до білків ЦНС). У разі виявлення ознак автоімунітету до нейробілків хворому проводять лікування клітинами алогенної ембріональної печінки (строк гестації 7-9 тижнів), які вводять внутрішньовенно в кількості 90-100млн. за одну ін'єкцію. Для цього в умовах маніпуляційної ембріональної клітини печінки попередньо розморожують згідно інструкції (температура води 38-40°C). Через 2-3 міс. після ін'єкції проводять повторне імунологічне обстеження, і у разі відсутності лабораторних ознак автоімунітету хворому проводиться операція. Під місцевим знеболюванням Sol. Lidocaini 0,5% 2,0мл в проміжку між 3 та 4 остистими виростами поперекових хребців проводять пункцію субарахноїдального простору. Після отримання під контролем мандрена 1мл прозорого ліквору для клінічних досліджень вводять 1мл ($30\text{-}40 \times 10^6$) ембріональних нейроклітин у вигляді суспензії. Введення менше ніж 30×10^6 ембріональних клітин є малоефективним, а застосування більшої кількості клітин може супроводжуватися негативними побічними явищами. Пункційну голку витягають. Накладають асептичну пов'язку. В горизонтальному положенні з опущеним головним кінцем ліжка хворий знаходиться 2 години.

Таких трансплантацій на курс лікування може бути 1-3 в залежності від індивідуальної реакції.

Конкретний приклад втілення.

Хвора К-а М.С., історії хвороби №6046, поступила у відділення відновної нейрохірургії Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України 11.10.2004 з діагнозом РС, цереброспинальна форма, вторинно-прогресуючий перебіг, 4-ий ступінь тяжкості. На МРТ в білій речовині паравентрикулярно виявлено вогнища демієлінізації приблизно 0,5см в діаметрі. Оцінка ступеня неврологічного дефіциту по шкалі EDSS - 5,5 балів. За 3 місяці до госпіталізації пройшла амбулаторне імунологічне обстеження, виявлені порушення імунного статусу (дисбаланс імунорегуляторних клітин) та ознаки автоімунітету - підвищений рівень автоантитіл до основного білка мієліну (32,6 проти $26,05 \pm 1,5$ у.од. у здорових осіб). Прийнято рішення про необхідність проведення хворій лікування ембріональними клітинами печінки людини з метою усунення ознак антигенспецифічних реакцій. В умовах маніпуляційної хворій внутрішньовенно введені кріоконсервовані ембріональні клітини печінки людини після розморожування згідно інструкції (температура води 38-40°C). Через 3 місяці повторне імунологічне обстеження засвідчило відсутність ознак автоімунітету до білків ЦНС - рівень автоантитіл до основного білку мієліна складав 26,8 у.од.. Таким чином, у хворої були усунуті обмеження до операції. Протокол операції. Назва операції - ін'єкційне ендолюмбальне введення суспензії кріоконсервованих нейроклітин ембріону. Кріоконсервовані нейроклітини ембріону людини розморожено згідно інструкції (температура води 38-40°C). Під місцевим знеболюванням Sol. Lidocaini 0,5% 2,0мл в проміжку між 3 та 4 остистими виростами поперекових хребців проведено пункцію субарахноїдального простору. Отримано прозорий ліквор. Лікворний тиск 120мм в. ст. Ендолюмбально введено 1мл суспензії ембріональних нейроклітин (30×10^6). Голка витягнена. На шкіру накладено асептичну пов'язку. Через добу після маніпуляції стан хворої задовільний, скарг немає, температура 36,7°C. Хвору виписано у задовільному стані.

21.03.2005 хвора поступила для чергового курсу лікування. 5 місяців тому пройшла курс лікування операцією ендолюмбального введення нейроклітин ембріону людини. Обстеження хворої засвідчило незначне (обсяг відновлення неврологічних функцій 0,5 бала) зменшення рухового дефіциту, зменшилися хиткість, наросла сила у кінцівках. При огляді - черепно-мозкові нерви без патології. М'язова сила у кінцівках 4 бали. Спастичний тетрапарез. Симптоми Бабінського з обох боків. Черевні рефлекси відсутні. Оцінка за шкалою EDSS - 5,0 балів. Імунологічне обстеження свідчить на користь наявності ознак автоімунітету - підвищений рівень автоантитіл до білка S-100 ($18,7$ проти $12,6 \pm 0,35$ у.од. у здорових осіб) та білка NSE ($35,7$ проти $23,1 \pm 0,6$ у.од. у здорових осіб). Таким чином, у хворої в сироватці виявлено збільшення автоантитіл до нейробілків S-100 та NSE, перед лікуванням ці показники не перевищували показники здорових осіб. Хворій проведено курс лікування

ембріональними клітинами печінки людини з метою усунення автоімунних змін, через 3 місяці проведено повторне імунологічне обстеження, яке підтвердило усунення лабораторних ознак автоімунітету, після чого хвора пройшла черговий курс лікування шляхом ендолюмбального введення нейроклітин ембріону людини. Спостереження триває.

За період з 2004 по 2006 рік в клініці відновної нейрохірургії Інституту нейрохірургії імені акад. А.П.Ромоданова АМН України проліковано 43 хворих з органічними ураженнями ЦНС методом ендолюмбального введення нейроклітин ембріону людини. 14 з цих хворих оперувалися після попереднього усунення лабораторних ознак автоімунітету до білків ЦНС шляхом внутрішньовенного введення ембріональних клітин печінки людини. Ці 14 хворих після лікування мали помірне покращення неврологічного стану, яке було досягнуто завдяки попереднього застосування ембріональних клітин печінки людини з метою усунення ознак автоімунітету. Такий метод дозволив проводити операційне лікування багаторазово в умовах стану толерантності до автоантигенів, що сприяло збільшенню ефективності лікування.

Список літератури:

1. Бадалян Л.О., Журба Л.Т., Тимонина О.В. Детские церебральные параличи /Киев, „Здоров'я". -1988. -327с.
2. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. Рассеянный склероз. /Москва. - 1997. -463с.
3. Lisyany N.I., Markova O.V., Rudenko V.A. The role of autosensitization to neuroantigens in the pathogenesis of epilepsy and infantile cerebral paralysis /J. of Neuroimmunology. -1994. -54/1-2. -P.177.
4. Лисяний Н.И. Иммунология и иммунотерапия рассеянного склероза. Киев. - 2003. -251с.
5. Сучков СВ., Мисиков В.К., Дурова О.М., Черепяхина Н.Е., Кимова М.В., Введенская О.Ю., Пономаренко НА., Пронина О.А., Котов СВ., Габибов А.Г. Аутоантитела при рассеянном склерозе патогенетическая и клиническая значимость /Невролог, журн. -2005. -Т.10, №4. -с.49-54.
6. Карлик С.Д., Плисс М.А., Конради А.В. и др. Композиция для лечения демиелинизирующих заболеваний и паралича путем введения ремиелинизирующих средств / Пат. №2005126728 (RU). - Оpubл. 2006.01.26.
7. Цимбалюк В.І., Маркова О.В., Пічкур Л.Д., Вотякова І.А. Спосіб лікуван ня розсіяного склерозу з використанням стовбурових клітин / Пат.№15356 (UA). - Оpubл. 15.06.2006.- Бюл. №6. -6с.